

急速凍結置換固定法—抗 LHC II 抗体—免疫電顕法による
同調培養 *Euglena* のゴルジ装置の観察[†]

遠藤麻美*・田中和幸*・三星暢公*・小早川ゆり**・
古田裕子****・長船哲齊*

(平成 11 年 10 月 21 日受付, 平成 11 年 12 月 17 日受理)

Observation of LHC II in the Golgi Apparatus during
the Cell Cycle of *Euglena* by Freeze Substituted
Immunoelectron Microscopy

Asami ENDO, Kazuyuki TANAKA, Masahiro MITSUBOSHI,
Yuri KOBAYAKAWA, Hiroko FURUTA and Tetsuaki OSAFUNE

Cells of *Euglena* contain a light-harvesting chlorophyll *a/b* complex associated with photosystem II (LHC II). In *Euglena*, the formation of the 26.5 kDa principal LHC II has a number of unusual features. The precursors to LHC II are large polypeptides containing multiple copies of LHC II, and photocontrol of their formation is largely translational. Under conditions favoring LHC II accumulation in the thylakoids, a reaction with anti-LHC II antibody can be observed in the Golgi by freeze substitution method-immunogold electron microscopy. *Euglena* cells were synchronized by 14 hr light periods alternating with 10 hr of darkness. Cell samples were obtained throughout the 24 hr period and were prepared for freeze substitution method-immunoelectron microscopy using protein A-gold and specific rabbit antibody against the 26.5 kDa LHC II apoprotein the principal polypeptide of the *Euglena* LHC II. The timing of the immunoreaction in the Golgi in synchronous cells suggests that the nascent LHC II passes through the Golgi on the way to the thylakoids. These observations suggest that light permits translation of polypeptide LHC II precursors on cytoplasmic ribosomes of the rough ER and that these pass through the ER to the Golgi where, presumably, further modifications take place. It is found that a new microtubular structure exists between the cisternae in the Golgi apparatus using freeze substitution method-immunoelectron microscopy.

Key words: Light-harvesting chlorophyll *a/b* complex photosystem II, Golgi apparatus, *Euglena gracilis* Z, Immunoelectron microscopy, Freeze substitution method

キーワード: アンテナタンパク質 LHC II, ゴルジ装置, ユーグレナ細胞, 免疫電子顕微鏡法, 急速凍結置換固定法

序 論

緑色植物が光合成を行っている場所は、葉緑体とよばれる細胞内小器官(オルガネラ)である。これまでの葉緑体の研究については、主に生化学的手法による光合成の解析が主流であり、葉緑体の分化過程、超微細構造に関する研究は極めて少ないのが現状である¹⁾。われわれ

の研究室では免疫電子顕微鏡法を用いて、単細胞鞭毛藻 *Euglena* や緑藻 *Chlamydomonas* などの葉緑体形成初期過程の研究や光合成タンパク質分子の動態に関する研究を行っている⁷⁻¹⁹⁾。

葉緑体の形態形成には、細胞核と葉緑体との相互の密接な連携が必要であることが知られている^{6, 7, 23)}。さら

[†] 本研究の一部は日本電子顕微鏡学会第 54 回学術講演会で講演した(仙台・国際センター・1998 年 5 月 19 日)

* 自然科学研究室(生命科学専攻), ** 運動方法(水泳研究室), *** 現在の所属: 県立・新潟高等学校

に、葉緑体タンパク質分子の大部分は細胞核の遺伝情報にコードし細胞質で合成され、何らかのルートによって葉緑体に輸送されていることが明らかになってきた^{20~24)}。細胞内の葉緑体構造内部は、従来から考えられていた静的な存在ではなく、さまざまな分子が絶え間なく行き交っている。葉緑体やミトコンドリアにみられるように、オルガネラ内部では遺伝子の発現や諸機能が一定の規則性を維持しながらダイナミックに変化している^{8, 9, 23)}。

光化学系 II に光を集める集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHC II) は細胞核にコードされ、細胞質で LHC II の前駆体タンパク質分子 200 kDa が合成され、何らかの方法によって葉緑体に運ばれて 2 段階のプロセッシングを受けた後に 26.5 kDa の分子になり、チラコイド膜に組込まれることが明らかにされている^{20~28)}。1990 年、Osafune らのグループは *Euglena* 細胞の葉緑体形成過程の明期における LHC II タンパク質分子の輸送経路を追跡し、分泌タンパク質以外の光合成タンパク質 LHC II がゴルジ装置を経由し、葉緑体へ輸送される現象を最初に見いだした^{11~13)}。本研究は、このような LHC II タンパク質分子の葉緑体への輸送経路の一部を構成するゴルジ装置の超微細構造を観察するのが目的である。すなわち、明暗同調培養法により同調培養した *Euglena gracilis* Z を用いて、最先端技法である急速凍結置換固定法および抗 LHC II 抗体-免疫電子顕微鏡法によって得られた結果について報告する。

方 法

a) 供試藻株

Euglena gracilis Z (IAM, Z-6) は東京大学分子細胞生物学研究所、藻類保存施設から分与され、東京医科大学微生物教室および日本体育大学健志台校舎自然科学研究室で継代培養した。

b) 明暗同調培養

Euglena を Cramer and Meyers 培地²⁾ 中で前培養し、細胞濃度が約 7.0×10^5 cells/ml になるように偏平フラスコ (厚さ約 2.5 cm, 500 ml 容量) に移し、温度 26°C, 1.5~2.0% の二酸化炭素 (CO₂) を含む空気を無菌的に連続通気した。同調培養は明暗法を用いた^{5, 8, 9)}。すなわち、細胞培養は明期には白色蛍光灯 (東芝 20 W) を光源として照度 1,500 lux で 14 時間照射し、暗期には 10 時間暗環境下で行った。明期 14 時間、暗期 10 時間の合計 24 時間を 1 サイクルとし、交互に反復することにより 72 時間で同調細胞集団を得た^{8, 9)}。同調培養の細胞数は約 $7.0 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/ml 前後の個数濃度に保つため、

24 時間ごとに新鮮培地 375 ml を細胞培養液 125 ml 中に加え、細胞数の希釈を行った。明期の同調細胞集団は活発な光合成により成長し、暗期に入ると初めて細胞分裂が起こり cell cycle の完了する 24 時間後には、娘細胞の個数は 2 倍に増加する。

c) 細胞数の測定法

Euglena の細胞数は精密粒度分布測定装置コールター Z-2 型 (Coulter, USA) を用いて算出した¹⁹⁾。

d) 急速凍結置換固定

Euglena の急速凍結置換固定法には Universal Cryofixation & Cryopreparation 装置 (Leica EM CPC, Austria) を用いて浸漬法で行った。同調培養した *Euglena* 培養液を経時的に 50 ml 採取し、遠心速度 $500 \times g$, 4°C で沈査を得た。グリッドに細胞懸濁液を 1 滴積載し、ろ紙を用いて培養液を除いた後、Leica EM CPC 装置のプロパン溶液を液体窒素 (-210°C) で -185°C に冷却し、*Euglena* 細胞を急速凍結した。凍結された細胞を -196°C に保ったグルタルアルデヒド・アセトン溶液の置換溶媒に移し、24 時間後、-20°C で 8 時間、次いで 4°C, 24 時間の置換固定した。その後、100% アセトン溶液で試料を洗浄し、Epoxy 812 樹脂 (Polysciences 社, USA) に包埋して 60°C, 3 日間の加熱重合を行った¹⁰⁾。

e) *Euglena* 細胞の化学固定法

同調培養した *Euglena* を経時的に採取 (50 ml) し、培養液中に最終濃度が 1% になるように 20% グルタルアルデヒド溶液 (v/v) を加え、4°C で 60 分間の固定処理を行った。前固定した細胞を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で $200 \sim 400 \times g$, 4°C, 5 分間遠心し、それらの洗浄を 3~4 回繰り返した。後固定は 0.5% 四酸化オスミウム水溶液 (w/v) で 4°C, 60 分間の処理を行った。次に、同じ条件下で細胞を蒸留水によって 2~3 回遠心洗浄し、2% アガロースに包埋した後、1 mm³ 前後のサイズに細切しブロックを作製した。試料ブロックは最初 4°C 中で各々 5 分間隔で 50%, 60%, 70% のエタノール系列、続いて室温下で 80%, 90% アセトン系列で脱水処理し、最後に 30 分間、100% アセトンにより脱水した。試料は Spurr 樹脂²⁵⁾ (Polysciences 社, USA) に包埋して 60°C, 3 日間の加熱重合を行った。

f) 抗 LHC II 抗体の作製

光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHC II) は単細胞鞭毛藻 *Euglena gracilis* var. *bacillaris* B 株から抽出、精製してウサギから抗 LHCP II 抗体を得た。当抗体は米国マサチューセッツ州、ブランダイス大学光細胞小器官研究所長 Jerome A. Schiff 教授 (Abraham and Etta Goodman Professor)

から分与された³⁾。

g) 免疫電子顕微鏡法

Euglena の免疫電子顕微鏡観察はすでに報告した方法

に準じて行った。

Euglena 細胞の培養液中に最終濃度が 1% (v/v) になるようにグルタルアルデヒドを添加し 4℃, 60 分間固定

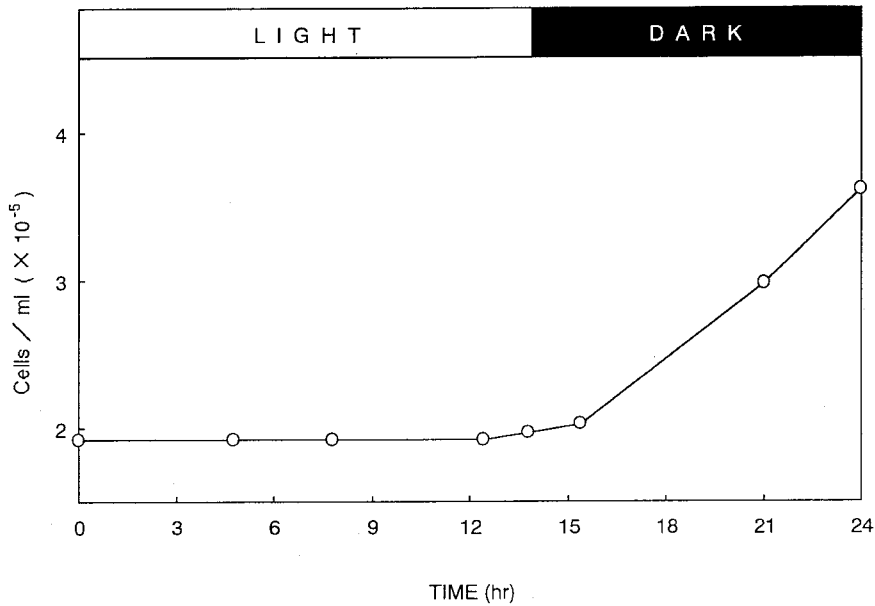


図 1 同調培養した *Euglena gracilis* Z の細胞数を示す。

Euglena 細胞は温度 26℃, 照度 1500 lux の明期 14 時間, 暗期 10 時間を反復すると同調した細胞集団を得ることができる。細胞集団は明期では細胞分裂が起こらず, 暗期に入り分裂が開始され暗期の終わり 24 時間で細胞の個数は 2 倍になり cell cycle を完了する。

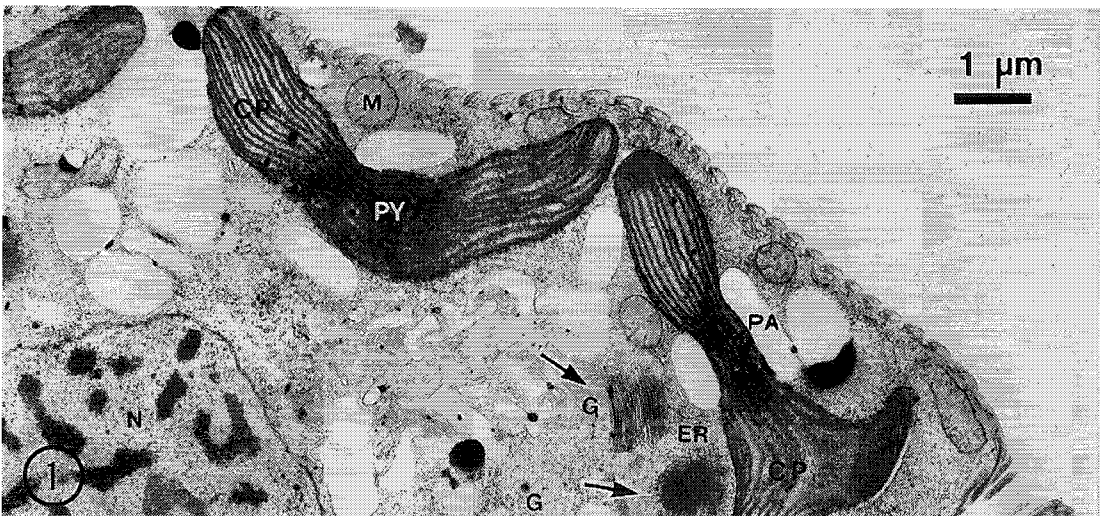


写真 1 同調培養した *Euglena gracilis* Z の超薄切片像。

光照射開始を 0 時間とし, 同調培養 9 時間細胞をグルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムで化学固定し, 透過型電子顕微鏡で撮影したものである。矢印はゴルジ装置 (G) を示す。細胞核 (N), ビレノイド構造 (PY), 葉緑体 (CP), ミトコンドリア (M) やパラミロン (PA) 構造が観察される。

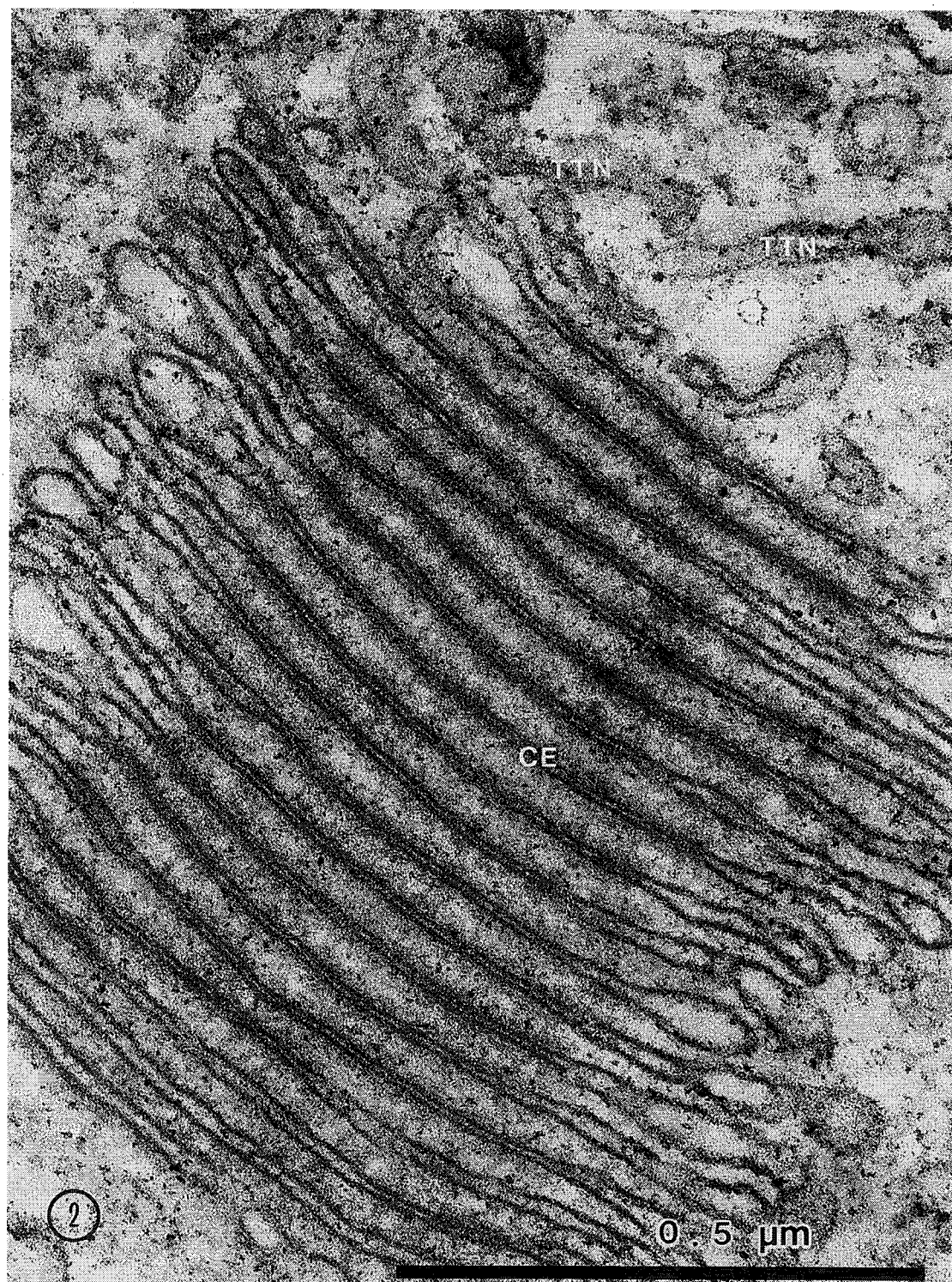


写真2

した。試料を4回新鮮培養液で洗浄後、2% アガロース (ナカライテスク KK) に包埋し、約1 mm³ 前後の寒天ブロックを作製した。寒天ブロックを50~90% エタノール系列および90~100% アセトン系列で脱水し、Epoxy 樹脂に包埋した。試料は超ミクロトーム (Leica 製 UCT, Austria) で120 nm の厚さに連続的に超薄切片し、ホルムバールまたはコロジオンの支持膜を張ったニッケル製の特殊グリッド (日新 EM) に積載した。薄片試料の抗原を樹脂表面に露出させるため、0.3% 過酸化水素で3~5分間処理した。次に、0.01 M リン酸緩衝生食水 (PBS) で4回洗浄を行った。洗浄操作はパラフィルムの上にPBSを水滴状に並べ、グリッドを順次に各々のPBS中へ移動させた。ブロッキングは洗浄後、PBSに1% ウシ血清アルブミンを添加したBSAで30分間処理した。一次抗体は抗LHC II抗体を用いた³⁾。抗LHC II抗体はBSAで20倍に希釈し超薄切片上で37℃、20分間反応させた。次に、超薄切片を0.05% Tween-20を含むPBSで洗浄した。2次抗体には5 nm または20 nm ゴールド (EY Lab. Inc., USA) を用いた。処理した超薄切片は0.05% Tween-20を含むPBSで15分間洗浄した後、さらに自動洗浄装置 (日新 EM) を用いて約15分間の水洗を行った。次に、3% 酢酸ウラニルで30分間染色し水洗、乾燥した¹⁸⁾。

h) 透過型電子顕微鏡観察

樹脂に包埋された試料は超ミクロトーム (Soval MT1, USA: Leica UTC, Austria) で超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよび酢酸鉛で電子染色の後、日本体育大学健志台校舎電子顕微鏡室の透過型電子顕微鏡 (100 CX, JEOL) で観察、撮影を行った¹⁷⁾。

結 果

図1に示すように、*Euglena* 細胞は明期、暗期を相互に反復することにより多くの細胞が極めて良い同調性を示し、cell cycle 中の各段階をほぼ同時に経過しながら成長、分裂を繰り返して増殖するという優れた特徴をもっている⁵⁾。すなわち、*Euglena gracilis* 細胞を24時間を1サイクルとして、照度1,500 luxの蛍光灯を14時間照射し、その後、暗期を10時間に設定すると細胞分裂は明期では起こらず、暗期に入り細胞分裂が開始する。暗期の終わり24時間では、細胞数は2倍 (3.6×10^5

cells/ml) になり1サイクルを完了する (図1)。

写真1は光照射開始を0時間とし、同調培養9時間細胞をグルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウムで固定して電子顕微鏡で観察、撮影したものである。矢印はゴルジ装置 (G) を示す。葉緑体 (CP)、小胞体 (ER)、ミトコンドリア (M)、細胞核 (N)、パラミロン (PA) やピレノイド (PY) の構造が超薄切片上に観察される。

写真2は同調培養9時間の*Euglena* 細胞のゴルジ装置を拡大したものである。*Euglena* のゴルジ装置はシスターネ (CE) の間に高電子密度の物質が観察される。さらに、矢印に示すようにシスターネ間を連結するような形態がみられることがわかった (写真2)。トランス側にはトランスゴルジ網様体 (TTN) 構造が観察される (写真2)。シスターネは (CE)、トランスゴルジ網様体は (TTN) で示す。

写真3はこのようなステージの*Euglena* 細胞をグルタルアルデヒド固定し抗LHC II抗体処理の後、protein A ゴールドで染色した。同調培養9時間細胞では、LHC II の配置を示す protein A ゴールド粒子はゴルジ装置および葉緑体へ特異的に局在しているのが鮮明に観察される (写真3)。矢印はゴルジ装置 (G) を示す。Protein A ゴールドは切片上のすべてのゴルジ装置に局在性が見られる (写真3)。

写真4は同調培養16時間の*Euglena* 細胞について、抗LHC II抗体-protein A ゴールド処理を行った免疫電子顕微鏡像である。Protein A ゴールドは完成された葉緑体構造 (CP) のみに特異的に局在し、9時間細胞で観察されたようなゴルジ装置 (図4の矢印に示す) への局在性は見られない。ピレノイド構造を取り巻くパラミロン構造 (PA)、ミトコンドリア (M) や貯留胞 (R) が観察される。

写真5~7は同調培養した*Euglena* の9時間細胞について、急速凍結置換法によって固定を行い、抗LHC II抗体で処理し、免疫電子顕微鏡法で観察したゴルジ装置である。Protein A ゴールド粒子 (サイズ20 nm) はゴルジ装置上に見られる。

写真5に示すように、protein A ゴールド粒子は、シスターネ構造の上とシスターネとシスターネとの間に局在しているのがわかる。矢印はシスターネとシスターネとの間に観察される高電子密度構造の存在を示してい

写真2 *Euglena gracilis* Z のゴルジ装置の超薄切片像。

同調培養9時間の*Euglena* 細胞のゴルジ装置を拡大したものである。*Euglena* のゴルジ装置はシスターネの間に高電子密度の物質が観察されるのが特徴である。このような物質は cell cycle を通じて観察される。ゴルジシスターネ (CE) はER側をシス部、中間部、トランス部に分かれトランス部の最外層はトランスゴルジ網様体 (TTN) が観察される。



写真3 同調培養した *Euglena gracilis* Z の急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡像。

同調培養9時間細胞をグルタルアルデヒド固定し抗 LHC II 抗体処理の後、protein A ゴールドで染色した。同調培養9時間細胞では、LHC II の配置を示す protein A ゴールド粒子はゴルジ装置および葉緑体へ特異的に局在している。切片上のすべてのゴルジ装置に protein A ゴールドの局在性が見られる。矢印はゴルジ装置 (G) を示す。

る。すなわち、*Euglena* 細胞を急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡観察することによって、初めてシスターネとシスターネとの間に微小管様構造の存在が明らかになった。

写真6はゴルジ装置を電子顕微鏡で1,320,000倍に拡大したものである。矢印はシスターネとシスターネとを連結すると思われる微小管様構造を示している。

写真7は *Euglena* 細胞をサイズ5 nm の protein A ゴールドを用いて、2次抗体処理を行ったものである。結果はサイズ20 nmと同様に、5 nm protein A ゴールドがゴルジ装置のシスターネ構造上と、シスターネとシスターネとの間に存在する高電子密度の微小管様構造に観察された。

考 察

細胞内にはさまざまなオルガネラがみられ、膜の透過や小胞体の輸送などによって物質の交換が行われている^{8~21)}。

オルガネラの中で葉緑体、ミトコンドリアや細胞核は独自の遺伝子DNAを有する。葉緑体形成は葉緑体の遺伝子情報だけでなく、細胞核のもつ遺伝子との共同作業によって初めて機能することが明らかになっている⁴⁾。このような事実は光合成装置の機能単位である炭酸固定の初期段階の酵素リブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼや、光化学反応中心タンパク質複合体の光化学系 II・集光性クロロフィル a/b 結合タンパク質複合体 (LHC II) などの合成にもみられる^{1, 8~24, 26~28)}。LHC II タンパク質分子は細胞核にコー

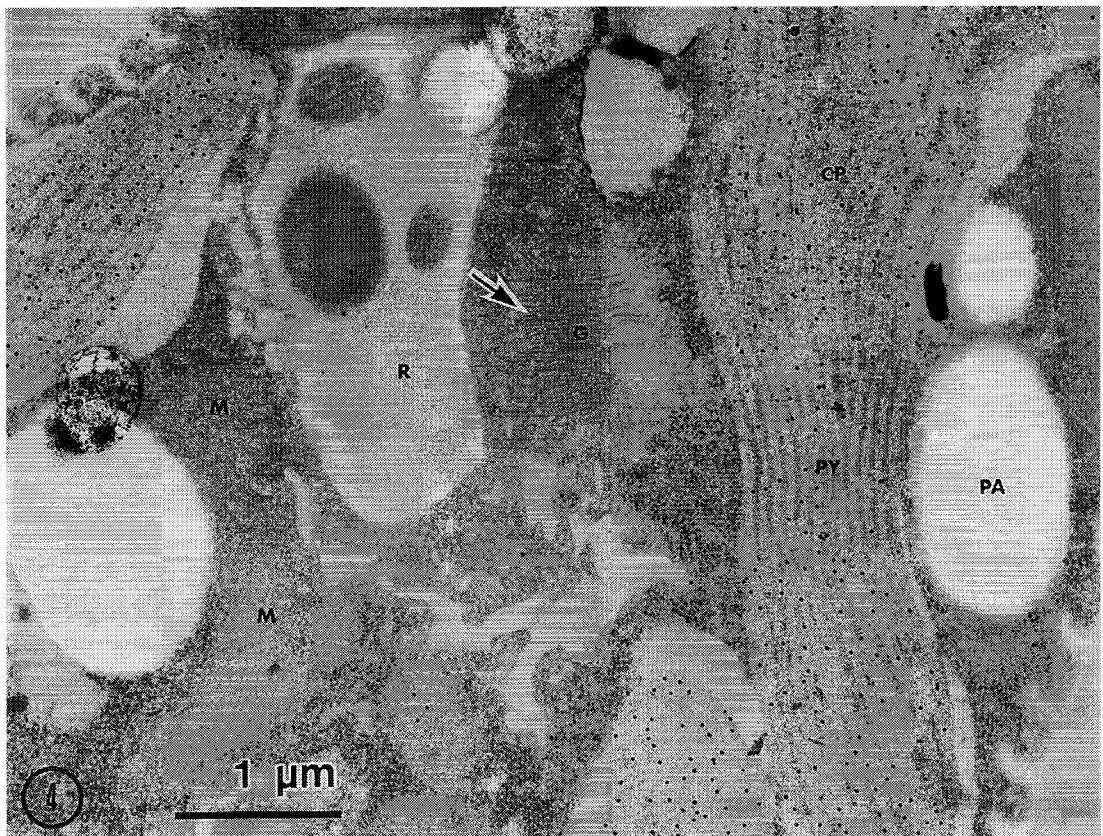


写真4 同調培養した *Euglena gracilis* Z の急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡像。

同調培養 16 時間の *Euglena* 細胞について、抗 LHC II 抗体-protein A ゴールド処理を行った免疫電子顕微鏡像である。Protein A ゴールドは完成された葉緑体構造 (CP) のみに特異的に局在し、9 時間細胞で観察されたようなゴルジ装置 (図 4 の矢印に示す) への局在性は見られない。ピレノイド構造を取り巻くパラミロン構造 (PA)、ミトコンドリア (M) や貯留胞 (R) が観察される。矢印はゴルジ装置 (G) を示す。

ドされて細胞質のリボゾームで合成され、ゴルジ装置を經由し、何らかの方法によって葉緑体に運ばれ 2 段階のプロセッシングを受けた後、チラコイド膜に組み込まれることが知られている^{1, 3, 20-28)}。ゴルジ装置は 1898 年イタリアの Camillo Golgi が神経細胞を銀染色し、光学顕微鏡で内網状構造を見だし最初にその構造が記載された。しかし長い間、ゴルジ装置は人工産物と思われてきた構造のひとつである。電子顕微鏡の開発に伴いゴルジ装置は動物や植物などすべての真核細胞内に普遍的に存在することが証明された。ゴルジ装置は cisternae (シスターネ)、vesicle (ゴルジ小胞) や vacuole (ゴルジ液胞) から構成されている細胞内小器官である。ゴルジ装置の膜は一部で融合や分散を繰り返す、極めてダイナミックな動態を示す。ゴルジ装置の機能は小胞体 (ER)

で合成されたタンパク質分子を濃縮、輸送および糖鎖付加などである。最近、生理化学的手法や免疫電子顕微鏡法を用いて、ゴルジ装置のもつ糖代謝、選別機構やプロセッシングなどの詳細な解析が行われている。また、ゴルジ装置は *de novo* に構築されることはなく、既存の構造を基にして形成されることも知られている。

Euglena 細胞のゴルジ装置は、シスターネが歪曲した円盤状構造で、直径 1 μm 前後の円形の扁平な袋が層板状に積み重なっている。その層数は細胞の種類によって著しく異なり、約 100 nm の間隔で 5 から 40 層までみられている。*Euglena* 細胞のゴルジ装置の顕著な特徴はゴルジシスターネの間に cell cycle (図 1) を通じて電子密度の高い物質が観察されることである (写真 1, 2)。ゴルジシスターネは ER 側をシス部、中間部、トランス部

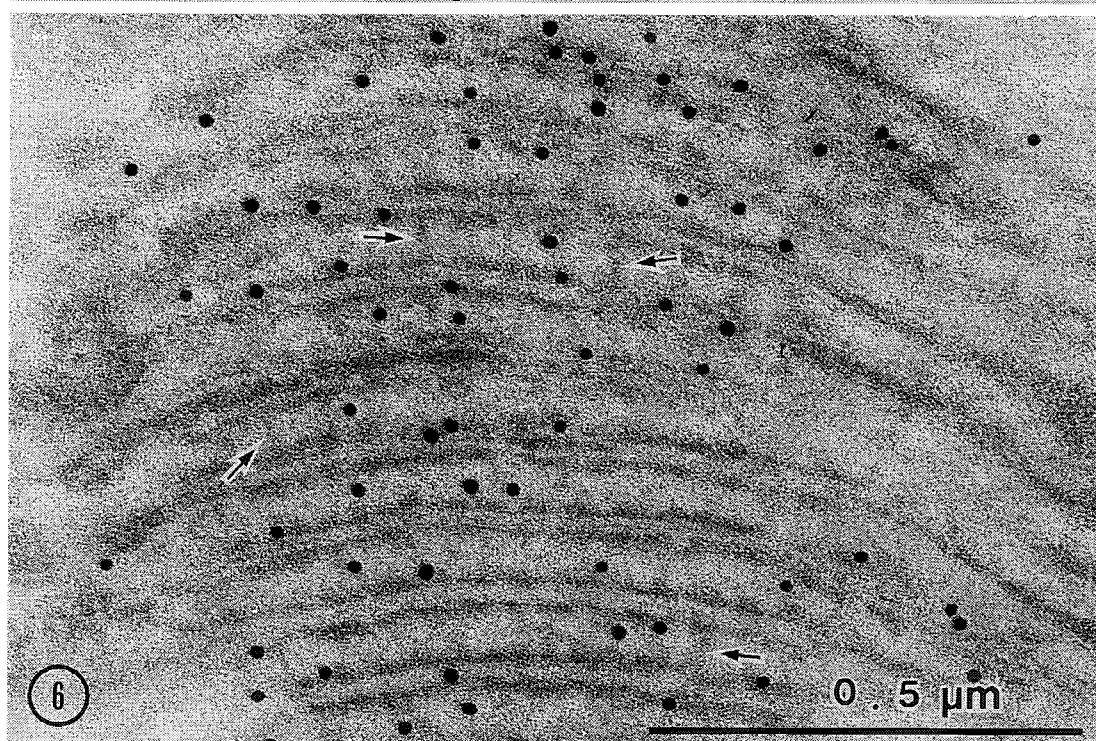
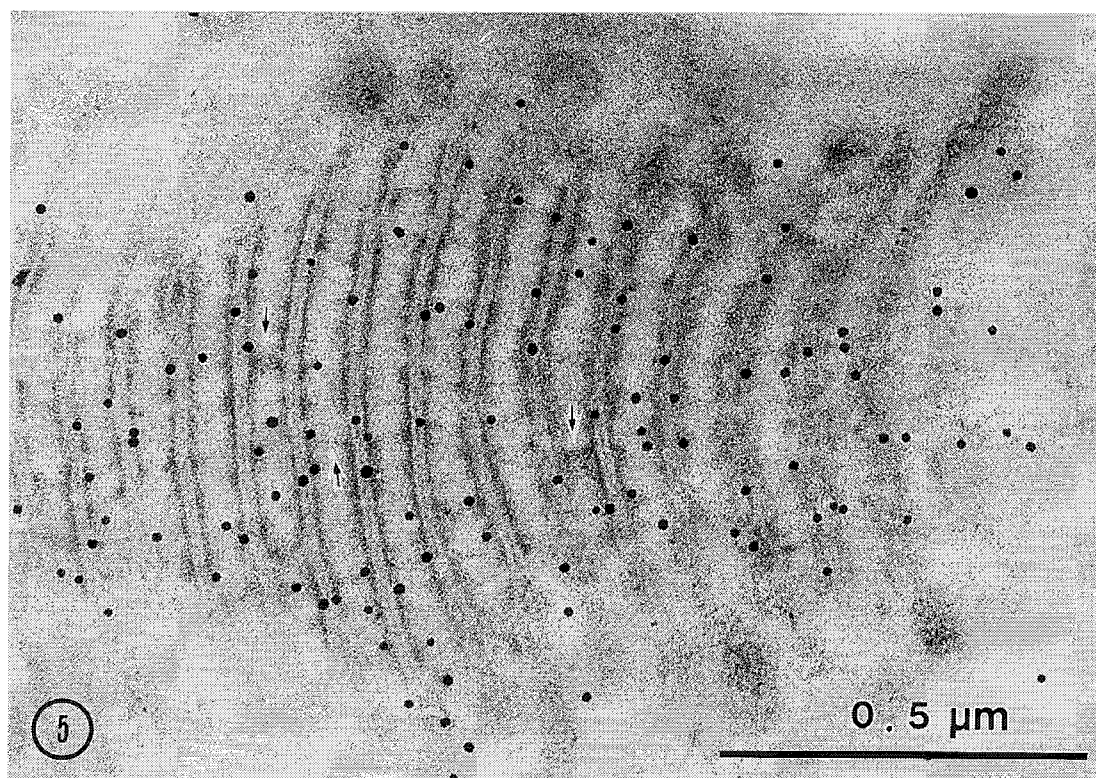


写真 5, 6

に分かれ、トランス部の最外層はトランスゴルジ網様体 (TTN) が観察される (写真 2)。小胞体膜結合のリボソーム上で合成された分泌タンパク質は、粗面 ER に入り内腔を通り滑面 ER で形成される輸送小胞に詰められて、最初にゴルジ装置のシス領域のゴルジシスターネへと輸送される。輸送小胞はゴルジシスターネの先端の新生面に融合し、分泌タンパク質はゴルジシスターネ内腔に入りトランス方向へ移動しながら、内部で濃縮されタンパク質の種類ごとに糖鎖の付加、選択的プロセッシングを受けることが明らかになっている。各タンパク質はトランスゴルジ網様体に到達して選別され、方向づけが行われ細胞内輸送が行われている。

図 1 に示すように、*Euglena* 細胞を無機培地²⁾に移し明期 14 時間、暗期 10 時間を繰り返すことによって同調した培養集団が得られる^{5, 8)}。Osafune らのグループは *Euglena* 細胞を明暗同調培養法で同調化し、LHC II タンパク質分子の細胞内局在性を免疫電子顕微鏡法を用いて追跡している^{8~18)}。先に報告したように、光照射直後の細胞を 0 時間とすると、LHC II はゴルジ装置への局在はみられない^{13~15)}。すなわち、光照射 3 時間には 60% のゴルジ装置上に LHC II の局在が認められ、さらに 8~10 時間には局在率は 90% 以上に達した。写真 3, 5~7 は *Euglena* 細胞の cell cycle 中の 9 時間細胞の免疫電子顕微鏡像である。LHC II タンパク質分子の局在性は細胞の固定方法を変えても LHC II が合成中には、ゴルジ装置に局在することが再確認された。*Euglena* 細胞における LHC II の合成が停止する 11 時間細胞以後、LHC II のゴルジ装置への局在性は急激な減少を示し、16 時間以後になるとゴルジ装置への局在は全くみられなかった。

今回、このような *Euglena* の同調細胞集団を経時的に採取し、最先端技法である急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡法で LHC II の細胞内局在性の再確認を行った (写真 3~7)。写真 3~7 に示すように、LHC II の細胞内配置は化学固定法から急速凍結置換固定に変えてもすべての葉緑体上に局在性がみられた。一方、細胞核にコードされ細胞質での LHC II の合成が停止した 16 時間細胞では、LHC II のゴルジ装置への局在性は全く観察されないことが確認された (写真 4)。この結果は、化

学固定法と急速凍結置換固定法による免疫電子顕微鏡像とも良く一致していることがわかった。以上の実験から細胞質で合成された LHC II タンパク質分子は合成期にはゴルジ装置に局在し、合成が完了し葉緑体に輸送された後にはゴルジ装置にみられないことが急速凍結置換固定法でも確かめられ、LHC II タンパク質分子はゴルジ装置を経由し、チラコイド膜へ輸送されることが細胞形態学的にも確かなものになった。最近、われわれが発見した *Euglena* 細胞にみられる、このような現象はネブラスカ州立大学の S. Schwartzbach 教授によって生化学的手法でも追試が行われ、現象の正しいことが証明されている²³⁾。

従来、ゴルジ装置のタンパク質、脂質や糖質の輸送はシスターネからシスターネへ輸送小胞が出芽と融合を繰り返してシスターネ間を移動し、シス側からトランス側へ運ばれることが知られている。したがって、シスターネとシスターネの間には、これまで直接の連絡する構造は存在しないとされてきた。写真 2 に明らかなように、*Euglena* 細胞のゴルジ装置はシスターネ間に高電子密度の物質がみられるが、シスターネの間には微小管様の特異的な構造はみられていない。写真 5~7 は 9 時間細胞にみられるゴルジ装置の急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡像の拡大である。すなわち、写真 5~7 に示すように *Euglena* 細胞を急速凍結置換固定したゴルジ装置の電子顕微鏡像には、シスターネ相互を連結する微小管様構造が明瞭に観察される。写真 6 は 1,320,000 倍に拡大した *Euglena* 細胞のゴルジ装置の像である。矢印に示すように、シスターネとシスターネとの間に微小管様構造が観察される (写真 6)。写真 7 は protein A ゴールドのサイズを 5 nm で処理したもので、20 nm サイズと同じように protein A ゴールドがゴルジ装置とシスターネとシスターネの中間部位の 2 カ所にみられる。すなわち免疫電子顕微鏡法によって、LHC II タンパク質分子がゴルジ装置のシスターネの中間部位に局在性が見られるのは、その部位に何らかの構造が存在していることを間接的に裏づけていると思われる (写真 6)。以上の結果から、写真 5~7 に示されたように、*Euglena* 細胞のゴルジ装置にはシスターネとシスターネとを相互に直接連絡する微小管様構造の存在が、最先端技法の急速凍結置換

写真 5, 6 急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡観察によるゴルジ装置像。

同調培養した *Euglena* の 9 時間細胞について、急速凍結置換法によって固定を行い、抗 LHC II 抗体で処理し免疫電子顕微鏡法で観察したゴルジ装置である。Protein A ゴールド粒子 (サイズ 20 nm) はゴルジ装置上にみられる。Protein A ゴールド粒子は、シスターネ上とシスターネとシスターネとの間に局在しているのがわかる。矢印はシスターネとシスターネとの間に観察される高電子密度の構造の存在を示している。写真 6 はゴルジ装置を 1,320,000 倍に拡大したものである。

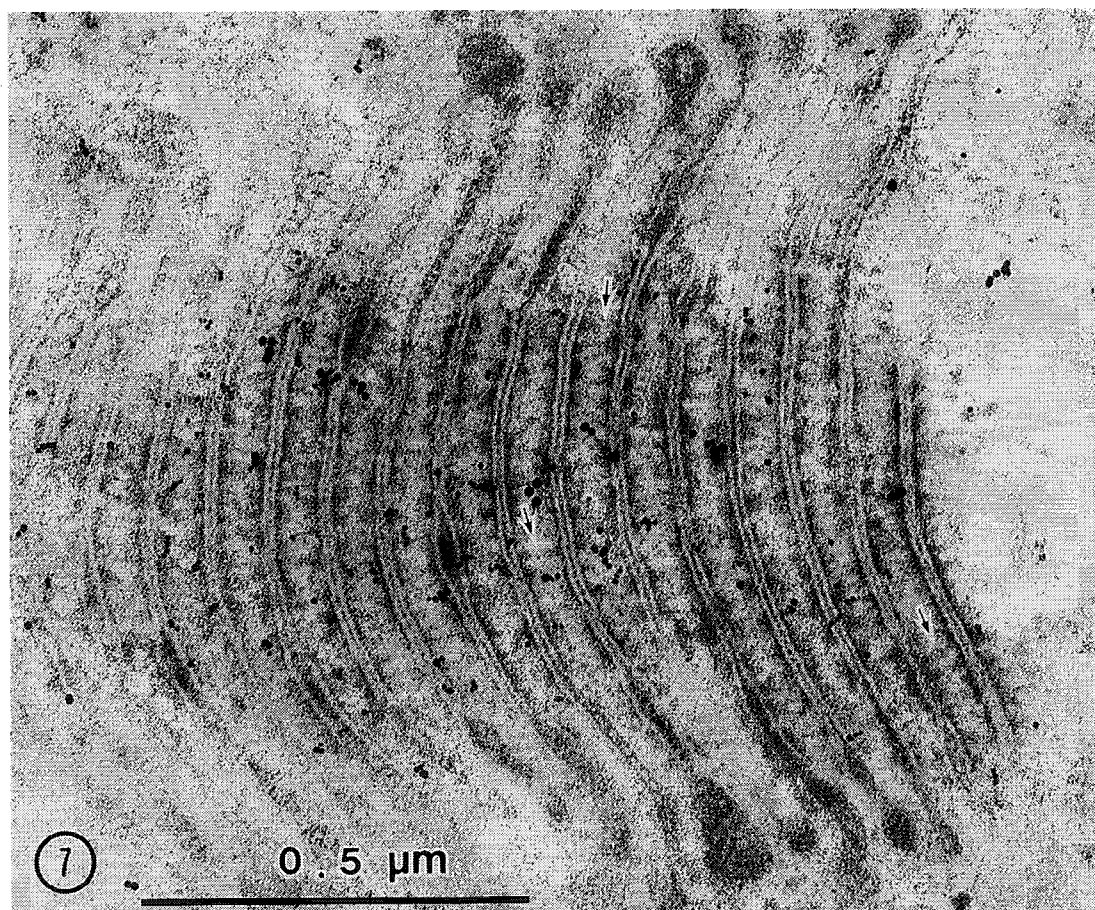


写真7 急速凍結置換固定-免疫電子顕微鏡観察によるゴルジ装置像。

Euglena 細胞を2次抗体処理の protein A ゴールドのサイズを5 nmで行った。結果は写真5,6と同様に、ゴールド粒子がゴルジ装置のシスターネ構造上と、シスターネとシスターネとの間の電子密度の高い微小管様構造にみられる。

固定法-電子顕微鏡観察により、今回初めて明らかになった。今後、ゴルジ装置の微小管様構造の実態の解析と、この現象が他の生物にも見られるかどうか調査したい。

結 語

先に、われわれは細胞核にコードされ細胞質で合成される光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHC II タンパク質分子) がゴルジ装置を経由してチラコイド膜に輸送されることを *Euglena* の葉緑体形成過程で発見した^{13, 23)}。

本研究は最先端技法である急速凍結置換固定法および免疫電子顕微鏡法によって、同調培養した *Euglena* 細胞の LHC II タンパク質分子がゴルジ装置に一時的に局在

する現象を再確認したものである。さらに、急速凍結置換固定法の応用により、ゴルジ装置のシスターネとシスターネとを直接連絡する微小管様構造を新しく見いだした。すなわち、抗 LHC II 抗体-免疫電子顕微鏡法によって、LHC II タンパク質分子がゴルジ装置とシスターネとシスターネとの層板上にある間隙とに局在性を示すことがわかった。この結果から、*Euglena* 細胞のゴルジ装置を構成するシスターネとシスターネとの間には構造の存在が明らかになった。以上のように、急速凍結置換固定法や免疫電子顕微鏡法の応用によって、細胞内のタンパク質の動態およびゴルジ装置の構造について詳細に追跡することができる。

今後、急速凍結置換固定法による、ゴルジ装置の微小管様構造の詳細な観察や、LHC II タンパク質分子がゴ

ルジ装置を直接通過する輸送機構の解明などが重要な研究課題であると思われる。

謝 辞

研究の一部は 1999 年度、文部省科学研究費・基盤研究 C-2 第 09640795 号 (長船) の補助によって行われた。

文 献

- 1) Brandt, P. and Von Kessel, B.: Cooperation of cytoplasmic and plastidial translation in formation of the photosynthetic apparatus and its stage-specific efficiency, *Plant Physiol.*, **72**, 616-619 (1983).
- 2) Cramer, M. and Myers, J.: Growth and photosynthetic characteristics of *Euglena gracilis*, *Arch. Mikrobiol.*, **17**, 384-402 (1952).
- 3) Cunningham, Jr. F. X. and Schiff, J. A.: Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll b. II. Polypeptide composition, *Plant Physiol.*, **80**, 231-238 (1986).
- 4) Greenblatt, C. L. and Schiff, J. A.: A pheophytin-like pigment in dark adapted *Euglena gracilis*, *J. Protozool.*, **6**, 23-28 (1959).
- 5) Hase, E. and Morimura, Y.: Synchronous culture of *Chlorella*. In *Methods in Enzymology*, Vol. XXIII, ed. by San Pietro, A., Academic Press, New York, pp. 78-84 (1975).
- 6) Houline, G. and Schantz, R.: Molecular analysis of the transcript encoding the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein in *Euglena gracilis*: unusual size of the mRNA, *Curr. Genet.*, **12**, 611-616 (1987).
- 7) Muchhal, U. and Schwartzbach, S. D.: Characterization of a *Euglena* chlorophyll *a/b* binding protein (LHCP II) gene encoding a polypeptide precursor, *Plant Physiol.*, **93**, S-544 (1990).
- 8) Osafune, T., Mihara, S., Hase, E. and Ohkuro, I.: Formation and division of giant mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture I. Some characteristics of changes in the morphology of mitochondria and oxygen-uptake activity of cells, *Plant Cell Physiol.*, **16**, 313-326 (1975).
- 9) Osafune, T., Ehara, T., Sumida, S. and Hase, E.: Interactions between the nucleus and cytoplasmic organelles during the cell cycle of *Euglena gracilis* in synchronized cultures II. Associations between the nucleus and chloroplasts at an early stage in the cell cycle under photoautotrophic conditions, *Plant Cell Physiol.*, **26**, 263-270 (1985).
- 10) Osafune, T., Sumida, S., Ehara, T. and Hase, E.: Three-dimensional distribution of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in chloroplasts of actively photosynthesizing cell of *Euglena gracilis*, *J. Electron. Microsc.*, **38**, 399-402 (1989).
- 11) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Immunolocalization of LHCP II apoprotein in the Golgi of *Euglena*. *Current Res. in Photosynthesis*, Vol. III, pp. 735-738 (1990).
- 12) 長船哲齊: 同調培養ユーグレナ細胞における光合成酵素の免疫電子顕微鏡法による観察, *植物細胞工学*, **2**, 641-651 (1990).
- 13) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Immunogold localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of *Euglena*, *Cell Struct. Funct.*, **15**, 99-105 (1990).
- 14) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Immunolocalization of LHCP II apoprotein in the Golgi during light-induced chloroplast development in non-dividing *Euglena* cells, *J. Electron. Microsc.*, **40**, 41-47 (1991).
- 15) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Stage-dependent localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of synchronized cells of *Euglena gracilis* by immunogold electron microscopy, *Exp. Cell Res.*, **193**, 320-330 (1991).
- 16) Osafune, T.: Three-dimensional distribution of LHCP II apoprotein immunoreaction in synchronous cells of *Euglena*, *Plant Morphology*, **3**, 49-55 (1991).
- 17) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Accumulation of LHCP II apoprotein immunoreaction in wax-rich cells of *Euglena* in low light or in the presence of streptomycin, *J. Structural Biol.*, **109**, 97-108 (1992).
- 18) 長船哲齊: 同調培養 *Euglena* 細胞の cell cycle における RuBisCO, LHC II タンパク質分子の動態, *日本医真菌学雑誌*, **39**, 135-146 (1998).
- 19) Osafune, T., Kobayakawa, Y. and Hase, E.: Immunogold localization of RuBisCO in developing proplastids of dark-grown wax-rich cells of *Euglena gracilis*, Venezuela, Margarita Island, *Electron. Microscopy* (1999).
- 20) Rikin, A. and Schwartzbach, S. D.: Extremely large and slowly processed precursors to the *Euglena* light harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins of photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5117-5121 (1988).

- 21) Rikin, A. and Schwartzbach, S. D.: Regulation by light and ethanol of the synthesis the light harvesting chlorophyll *a/b* binding protein of photosystem II in *Euglena*, *Planta*, **178**, 76–83 (1989).
- 22) Schiff, J. A., Schwartzbach, S. D., Osafune, T. and Hase, E.: Photocontrol and processing of LHCP II apoprotein in *Euglena*; Possible role of Golgi and other cytoplasmic sites, *J. Photochem. Photobiol.*, **11**, 219–236 (1991).
- 23) Schwartzbach, S. D., Osafune, T. and Löffelhardt, W.: Protein. Import into Cyanelles and Complex Chloroplast. KLUWER Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1–17 (1998).
- 24) Spano, A. J., Ghaus, H. and Schiff, J. A.: Chlorophyll-protein complexes and other thylakoid components at the low intensity threshold in *Euglena* chloroplast development, *Plant Cell Physiol.*, **28**, 1101–1108 (1987).
- 25) Spurr, A. R.: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy, *J. Ultrastructure Res.*, **26**, 31–43 (1969).
- 26) Sulli, C. and Schwartzbach, S.: The polyprotein precursor to the *Euglena* light harvesting chlorophyll alb-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polyprotein processing, *J. Biol. Chem.*, **270**, 13084–13090 (1995).
- 27) Sulli, C. and Schwartzbach, S.: A soluble protein is imported into *Euglena* chloroplasts as a membrane-bound precursor, *The Plant Cell*, **8**, 45–53 (1996).
- 28) Weiss, C., Houlne, G., Schantz, M. L. and Schantz, R.: Photoregulation of the synthesis of chloroplast membrane proteins in *Euglena gracilis*, *J. Plant Physiol.*, **133**, 521–538 (1988).